



**ADAPTRES**

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para  
a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia

# Procedimiento de trabajo

Detección y recuento de *Legionella spp.*  
en aguas con alto contenido en materia  
orgánica (concentración por filtración)

(ISO 11731:2017)

Objetivo 2 - Actividade 2.2

**Autor: Néstor Abreu**

**Revisado por: Gilberto Martel y Vanessa Millán**

**Parceiro: ITC**

**Fecha: octubre de 2020**

**Versión: 1**





# INDICE

1. OBJETO .....	2
2. ALCANCE .....	2
3. REFERENCIAS .....	2
4. DEFINICIONES .....	3
5. FUNDAMENTO .....	4
5.1. Filtración por membrana .....	4
5.2. Confirmación .....	4
6. MEDIOS DE CULTIVOS Y REACTIVOS .....	4
6.1. Reactivos .....	4
6.2. Soluciones .....	5
6.3. Medios de cultivos .....	6
7. EQUIPAMIENTO Y MATERIAL FUNGIBLE .....	9
8. PROCEDIMIENTO .....	10
8.1. Toma de muestras .....	10
8.2. Concentración por filtración seguida de un procedimiento de elución .....	10
8.3. Descontaminación e inoculación de los medios de cultivo .....	11
8.3.1. Sin tratamiento de descontaminación .....	11
8.3.2. Tratamiento térmico .....	11
8.3.3. Tratamiento ácido .....	12
8.4. Incubación .....	12
8.5 Examen de placas .....	13
8.6 Confirmación de las colonias presuntivas en medio de cultivo: agar BCYE y agar BCYE-cys .....	13
9. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS .....	14
10. OBSERVACIONES .....	15



## 1. OBJETO

El objetivo de este procedimiento es establecer un plan de trabajo para la detección y cuantificación de *Legionella spp.* en aguas con alto contenido en materia orgánica, como es el caso de las aguas depuradas.

## 2. ALCANCE

Este procedimiento se establece para la detección de *Legionella spp.* en aguas con alto contenido en materia orgánica mediante filtración y cultivo en medios selectivos.

## 3. REFERENCIAS

- Bopp CA et al. 1981. Isolation of *Legionella spp.* from environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium. J. Clin. Microbiol. 13(4), 714-719.
- Dennis PJ et al. 1984. Comparison of isolation methods for *Legionella spp.*, *Legionella* Proceeding of the 2nd International Symposium. American Society for Microbiology, 294-296.
- Ditommaso S. 2011. Recovery of *Legionella* species from water samples using an internal method base on ISO11731: suggetions for revision and implementation. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 70, 200-206.
- ISO 13843 Water quality. Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods.
- ISO/IEC 17025 General requirements for the competence of testing and calibration laboratorios.
- ISO 11731:1998 Calidad del agua – Detección y recuento de *Legionella*.
- ISO 11731-2:2004 Calidad del agua – Detección y recuento de *Legionella* – Parte 2: Método de filtración directa en membrana para aguas con bajos contenido en bacterias.
- ISO 5667-1:2006 Calidad del agua. Muestreo – Parte 1: Guía para el diseño de los programas de muestreo y técnicas de muestreo.
- ISO 5667-2:1991 Calidad del agua. Muestreo – Parte 2: Guía de técnicas de muestreo.
- ISO 5667-3:2012 Calidad del agua. Muestreo – Parte 3: Conservación y manipulación de las muestras de agua.
- Smith L et al. 1993. Comparision of membrane filters for recovery of Legionellae from water samples. Appl. Environ. Microbiol. 59(1), 344-346.
- Wadowsky RM, Yee RB. 1981. Glycine-containing selective medium for isolation of Legionellaceae from environmental specimens. Appl. Environ. Microbiol. 42(5), 768-772.



**ADAPTaRES**

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



## 4. DEFINICIONES

**Legionella:** Es una bacteria grampositiva que vive en ambientes húmedos y que se transmite por el aire. Este género de bacterias son capaces de crecer normalmente en un agar tamponado de extracto de levadura y carbón activo (BCYE), que contiene L-cisteína y sales de hierro (III).

Se han reconocido 14 serogrupos, siendo el serotipo 1 el más asociado con las enfermedades que provoca este bacilo. Los lugares donde se puede encontrar más fácilmente son los conductos de aire acondicionado, las tuberías, las alcachofas de las duchas y los sistemas de refrigeración. Desde allí se extiende por el aire a los pulmones de los afectados.

En 1976 soldados de la Legión Americana asistían a una convención anual en la ciudad Estadounidense de Filadelfia cuando una enfermedad respiratoria se empezó a extender. La culpable es una bacteria que no se conocía y que el centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta bautizó en 1978 (*Legionella pneumophila*).

Es la causante de 2 enfermedades de pronóstico muy desigual. La más conocida es la enfermedad del legionario, una infección respiratoria severa que puede implicar neumonía. De hecho, se cree que el 20% de los casos de neumonía está provocado por esta bacteria. La otra dolencia que causa es mucho menos grave. Se trata de la fiebre de Pontiac y es una enfermedad que cursa con episodios de fiebre alta, que dura poco tiempo (desde horas, hasta como mucho cinco días) y que se suele curar por sí sola.

La enfermedad del legionario o legionelosis, incluye dolores de cabeza fuertes, fatiga, pérdida de peso, dolor muscular y fiebre. Los enfermos también sufren episodios de tos, que puede ser seca o con esputos. En muchos casos la bacteria ataca a los pulmones y los afectados desarrollan neumonía. Los síntomas de la fiebre de Pontiac son: fiebre y dolor muscular y los afectados por esta enfermedad no sufren neumonía.

*Legionella pneumophila* vive en los lugares húmedos, desde allí se expande, por el aire hasta los enfermos. La manera que éstos contraen la enfermedad es la microaspiración de las partículas de agua contaminadas. La enfermedad del legionario no se contagia de persona a persona. Un nebulizador infectado puede ser también una forma de transmitir la legionelosis. Se han dado casos de personas que se han contagiado por compartir un respirador que tenía *Legionella pneumophila* en un centro hospitalario.



**ADAPTaRES**

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



## 5. FUNDAMENTO

### 5.1. Filtración por membrana

El método de filtración por membrana para la determinación de *Legionella spp.* en aguas se basa en la filtración de un volumen determinado de agua a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro capaz de retener las bacterias (0,22µm). El filtro se lava posteriormente para separar las bacterias retenidas que serán identificadas por cultivo.

El eluido o líquido de lavado se divide en varias fracciones, que después de ser sometidas a tratamiento térmico y ácido se cultivan en medio selectivo para *Legionella*.

### 5.2. Confirmación

Después de la incubación, las colonias de morfología característica que crecen en el medio selectivo se consideran *Legionella* presuntivas. Estas colonias se confirman como tal mediante un subcultivo para poner en evidencia que su crecimiento necesita L-cisteína y hierro (III). En el caso de que se requiera la identificación de las especies y serotipos, se deben utilizar ensayos complementarios.

## 6. MEDIOS DE CULTIVOS Y REACTIVOS

### 6.1. Reactivos

1. Cloruro sódico (NaCl) (CAS 7647-14-5) (Scharlab Ref. SO022710500 o similar).
2. Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) (CAS nº 10034-99-8) (Scharlab Ref. MA00850500 o similar).
3. Cloruro de calcio dihidratado (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) (CAS nº 10035-04-8) (Scharlab Ref. CA01940500 o similar).
4. Hidrógeno fosfato de disodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (CAS nº 7558-79-4) (Scharlab Ref. SO03370500 o similar).
5. Dihidrógenofosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (CAS nº 7778-77-0) (Scharlab Ref. PO02600500).
6. Ácido clorhídrico 37% (HCl) (CAS nº 7647-01-0) (Scharlab Ref. AC07411000 o similar).
7. Cloruro de potasio (KCl) (CAS nº 7447-40-7) (Scharlab Ref. PO02000500 o similar).
8. Hidróxido de potasio (KOH) (CAS nº 1310-58-3) (Scharlab Ref. PO02751000 o similar).
9. Agua destilada tipo II.
10. Alcohol para quemar.



## 6.2. Soluciones

### 1. Solución salina de Page (SSP) (diluyente).

Reactivo	Cantidad
Cloruro sódico	0,120 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,004 g
Cloruro de calcio hidratado	0,004 g
Hidrógeno fosfato de disodio	0,142 g
Dihidrógenofosfato de potasio	0,136 g
Agua destilada	1000 ml

Para una preparación más precisa, se recomienda preparar un volumen de 10 l. de la solución y repartirlo en volúmenes más pequeños, según se requiera y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

### 2. Solución ácida.

- Solución A: Se prepara una solución de 0,2 mol/l de ácido clorhídrico (HCl) por adición de 1,74 ml de HCl concentrado ( $\rho=1,184$ , contenido mínimo 37%), o 20 ml de HCl concentrado ( $\rho=1,16$ , contenido mínimo 31,5%) a 1 l. de agua.
- Solución B: Se prepara una solución de 0,2 mol/l de cloruro de potasio (KCl) disolviendo 14,9 g de KCl en 1 l. de agua.
- Solución de KOH: 1 mol/l.
- Solución ácida de trabajo: Se mezclan 3,9 ml de la solución A y 25 ml de la solución B. Se ajusta el pH a  $2,2\pm 0,2$  añadiendo la cantidad necesaria de la solución de KOH. Se conserva



en un recipiente de vidrio adecuado, en la oscuridad y a temperatura ambiente, durante un tiempo no superior a 1 mes.

### 6.3. Medios de cultivos

1. Legionella BCYE agar Base (Scharlab Ref. 01-687-500 o VWR Cat. nº 84629.0500 o similar).

Medio sólido usado para la detección, aislamiento y enumeración de *Legionella* en aguas de acuerdo a las normas ISO 11731:1998, 11731-2:2004 y 11731-2:2017.

#### Composición:

Reactivo	Cantidad
Carbón activo	2,00 g
Extracto de levadura	10,00 g
Agar	15,00 g

Se disuelven 13,5 g del liofilizado en 500 ml de agua destilada y se lleva a ebullición hasta su total disolución. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar hasta unos 47-50°C y, asépticamente, añadir los distintos suplementos para lograr los medios de cultivos empleados en esta norma.

2. Agar tamponado de extracto de levadura y carbón activo (BCYE). (Legionella BCYE agar base + suplemento de crecimiento para Legionella BCYE (Scharlab Ref. 06-137LYO1 en viales, VWR Cat. nº 84726,0001 o similar).

#### Composición:



Reactivo	Cantidad
Carbón activo	2,00 g
Extracto de levadura	10,00 g
Agar	15,00 g
Tampón ACES	10,00 g
Hidróxido potásico	2,800 g
L-Cisteína HCl	0,400 g
Pirofosfato de hierro (III)	0,250 g
$\alpha$ -Ketoglutarato potásico	1,000 g

Se reconstituye un vial liofilizado de suplemento de crecimiento para Legionella BCYE añadiendo asépticamente un vial de hidratación (se suministra con el vial de suplemento, o en cualquier caso utilizar 9 ml de agua destilada estéril) a 500 ml de Legionella BCYE agar Base esterilizado por autoclave y a una temperatura de unos 47-50°C. Se mezcla suavemente y se vierte, asépticamente, en placas de Petri de 90 mm. Dejar gelificar en una superficie horizontal y conservar 1 mes a 5±3°C.

3. Agar tamponado de extracto de levadura y carbón activado sin L-cisteína (BCYE-cys). Legionella BCYE agar base + suplemento de no crecimiento para *Legionella* (Scharlab Ref. 06-134-LYO1, VWR Cat. nº 84727,0001 o similar).

Composición:

Reactivo	Cantidad
Carbón activo	2,00 g
Extracto de levadura	10,00 g
Agar	15,00 g





Tampón ACES	10,00 g
Hidróxido potásico	2,800 g
Pirofosfato de hierro (III)	0,250 g
$\alpha$ -Ketoglutarato potásico	1,000 g

Se reconstituye un vial liofilizado de suplemento de no crecimiento para *Legionella* añadiendo asépticamente un vial de hidratación (se suministra con el vial de suplemento, o en cualquier caso utilizar 9 ml de agua destilada estéril) a 500 ml de Legionella BCYE agar Base esterilizado por autoclave y a una temperatura de unos 47-50°C. Se mezcla suavemente y se vierte, asépticamente, en placas de Petri de 90 mm. Dejar gelificar en una superficie horizontal y conservar 1 mes a 5±3°C.

Este suplemento selectivo no contiene cisteína, factor de crecimiento esencial para *Legionella*, que permite confirmar falsos positivos si llegan a crecer en el medio.

4. Agar Selectivo Legionella BCYE (GVPC). Legionella BCYE base + suplemento selectivo GVPC (Scharlab Ref. 06-138LYO1, VWR Cat. nº 84725,0001 o similar).

Composición:

Reactivo	Cantidad
Carbón activo	2,00 g
Extracto de levadura	10,00 g
Agar	15,00 g
Tampón ACES	10,00 g
Hidróxido potásico	2,800 g
L-Cisteína HCl	0,400 g
Pirofosfato de hierro (III)	0,250 g



$\alpha$ -Ketoglutarato potásico	1,000 g
Glicina	1,500 g
Vancomicina	0,0005 g
Polimixina B sulfato	40000 IU
Cicloheximida	0,040 g

Se reconstituye un vial liofilizado de suplemento de no crecimiento para *Legionella* añadiendo asépticamente 6 ml de agua destilada estéril a 500 ml de Legionella BCYE agar Base esterilizado por autoclave y a una temperatura de unos 47-50°C. Se mezcla suavemente y se vierte, asépticamente, en placas de Petri de 90 mm. Dejar gelificar en una superficie horizontal y conservar 1 mes a 5±3°C.

5. Cepa control de *Legionella pneumophila* ssp. *pneumophila* ATCC® 33152 (KIWIK-STIK Duo Pack; Scharlab Ref. 660-00211V o similar).

## 7. EQUIPAMIENTO Y MATERIAL FUNGIBLE

1. Autoclave capaz de mantener una temperatura de 121±3°C.
2. Balanza de precisión (0,001 g).
3. Agitador vórtex.
4. Baño de agua termostatzado capaz de alcanzar 50±1°C.
5. Placa calefactora con agitación (que alcance 100°C).
6. Equipo de filtración por membrana conforme a la Norma ISO 8199 (rampa de filtración de 3 puestos más bomba de vacío).
7. Embudos de filtración estériles desechables de 100 ml (se pueden reutilizar una vez autoclavados. Soportan varios ciclos de autoclave).
8. Filtros de membrana estériles, de 0,22 µm de tamaño nominal de poro y cuadrículadas.
9. Pinzas de laboratorio de punta plana para la manipulación de los filtros de membrana.
10. Vaso de vidrio de unos 50 ml de capacidad con alcohol para quemar.
11. Soplete de laboratorio
12. Placas de Petri de 90 mm estériles.
13. Estufa microbiológica, capaz de mantener una temperatura de 36±2°C.
14. pHmetro.



**ADAPTaRES**

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



15. Lámpara ultravioleta.
16. Refrigerador.
17. Pipeta automática de 100-1000 µl.
18. Pipeta automática de 1000-5000 µl.
19. Gradillas para tubos de 50 ml.
20. Mechero de gas butano o de alcohol.
21. Guantes desechables de varias tallas (S, M, L, XL).
22. Puntas estériles para pipeta automática 100-1000 ul.
23. Puntas estériles para pipeta automática 1000-5000 µl.
24. Tubos tipo Falcon de 50 ml.
25. Material de vidrio para la preparación del medio de cultivo.
26. Frascos lavadores para SSP.
27. Material de vidrio para la preparación de los medios de cultivo.

## 8. PROCEDIMIENTO

### 8.1. Toma de muestras

Para la toma de muestras se requieren frascos de vidrio neutro estériles, preferentemente de borosilicato de 500/1000 ml de capacidad, con boca ancha y tapa esmerilada o de rosca. Se pueden utilizar también frascos estériles de plástico de un solo uso.

Las muestras se deben analizar lo antes posible. Si el tiempo de traslado no es superior a 2 h., la muestra se puede transportar en las condiciones iniciales. Si el periodo de transporte es más prolongado se debe conservar a 4º C. El análisis microbiológico debe realizarse antes de que hayan transcurrido 6- 8 h. desde la toma de la muestra. El muestreo se realiza conforme a la Norma ISO 5667-1, ISO 5677-2 e ISO 5667-3.

### 8.2. Concentración por filtración seguida de un procedimiento de elución

La filtración se realiza por filtración al vacío y la velocidad del flujo debe ajustarse de forma que no exceda el máximo especificado por el fabricante para el tipo o tamaño de filtro.

El equipo de filtración debe estar instalado con excepción del embudo. Tanto el embudo como el soporte de filtración deben estar estériles. Se debe trabajar cerca de una fuente de calor (mechero de gas o alcohol), para crear un flujo de aire ascendente y evitar contaminaciones accidentales. Al



**ADAPTaRES**

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



**MAC 2014-2020**  
Cooperação Territorial

**Interreg**   
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

conectar la bomba comprobar que proporciona suficiente vacío, si no sucede esto, comprobar que las llaves estén cerradas y que las conexiones no presenten fugas. Las pinzas deben estar en un lugar accesible y se deben mantener en un vaso pequeño con las puntas sumergidas en alcohol de quemar o similar para su esterilización por flameado antes de cada uso.

1. Se coloca el filtro de membrana sobre el soporte de filtración estéril, se coloca el embudo, se añade la muestra a filtrar y se filtra la muestra de agua a través del filtro de membrana aplicando vacío. El volumen filtrado depende del contenido de partículas del agua o del nivel de detección deseado. Para aumentar la recuperación se pueden utilizar varios filtros. Anotar el volumen filtrado.
2. Se retira cuidadosamente el filtro de membrana del soporte de filtración con las pinzas estériles. Se debe manipular con cuidado para evitar la pérdida de depósito residual.
3. El filtro de membrana se corta en varias porciones utilizando unas tijeras estériles para facilitar la elución. Los fragmentos se colocan con la zona de filtrado hacia arriba en un tubo con rosca (puede servir un tubo tipo Falcon de 50 ml).
4. Se añaden 10 ml de diluyente estéril o de la propia muestra y se agita vigorosamente utilizando un agitador vórtex durante al menos 2 min.
5. Con ayuda de las pinzas estériles se retiran los fragmentos del filtro de membrana y se desechan en un contenedor adecuado.
6. Este concentrado representa la muestra preparada. Se registra el volumen de concentrado.
7. El concentrado se divide en tres porciones. Se utiliza una porción sin tratamiento, otra porción para el tratamiento térmico y la última para el tratamiento con la solución ácida.

### 8.3. Descontaminación e inoculación de los medios de cultivo

Se recomienda analizar los concentrados inmediatamente. En caso contrario se almacenarán a 2-6°C en oscuridad durante no más de 14 días.

#### 8.3.1. Sin tratamiento de descontaminación

- Se inoculara 0,1 ml de concentrado en una placa de medio GVPC.

#### 8.3.2. Tratamiento térmico

- Transferir 0,5 ml de concentrado a un frasco con tapón de rosca.



**ADAPTaRES**

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



- Mantener en un baño de agua termostaticado a 50°C durante 30±2 minutos.
- Inocular 0,1 ml en una placa de GVPC.

Se deben utilizar volúmenes pequeños ( $\leq 5$  ml) para garantizar un periodo corto de tiempo hasta que se alcance la temperatura deseada. Si se tratan muchas muestras simultáneamente, o bien si se utilizan recipientes de paredes gruesas, se debe monitorizar la temperatura en un recipiente independiente similar al utilizado para la muestra.

El periodo de tratamiento comienza una vez alcanzada la temperatura requerida. Los volúmenes grandes de muestra o los recipientes de paredes gruesas deberán enfriarse después de retirarlos del baño de agua para evitar un sobrecalentamiento. A partir de recipientes con paredes delgadas y/o volúmenes pequeños, se inocula el medio de cultivo tan pronto como sea posible después de la retirada del baño de agua.

### 8.3.3. Tratamiento ácido

- Centrifugar de 1 a 10 ml del concentrado a 6000g durante 10 min. o 3000g durante 30 min.
- Eliminar la mitad del sobrenadante con una pipeta estéril y agitar el sedimento vigorosamente.
- Añadir solución ácida pH 2,2 hasta el volumen original, mezclando suavemente.
- Mantener el contacto durante 5 min.
- Inocular inmediatamente 0,1 ml en una placa de GVPC.
- Para los cálculos posteriores se debe tener en cuenta que el concentrado se ha diluido  $\frac{1}{2}$ .
- Alternativamente, se puede emplear solución ácida 10X pH 2,2, que se diluye 1/10 con la propia muestra y se mantienen en contacto igualmente durante 5 min., evitando la centrifugación antes de la inocular en GVPC.

### 8.4. Incubación

Dejar reposar las placas hasta que el volumen inoculado se haya absorbido. Seguidamente, las placas se incuban boca abajo, a una temperatura de 36±2°C en aerobiosis durante un periodo de 7 a 10 días. Se debe crear una atmósfera húmeda a fin de evitar la desecación de las placas, para lo que se puede colocar en la base de la estufa microbiológica un recipiente con agua destilada con una pequeña cantidad de sulfato de cobre (renovar esta solución 1 o 2 veces por semana), si fuera posible.

## 8.5 Examen de placas

Se realiza un primer examen de las placas el 2º, 3º, 4º o 5º días, seguido de una inspección final al terminar el periodo de incubación, para poder identificar las muestras que presentan sobrecrecimiento. No será posible calcular el resultado cuantitativo definitivo hasta que finalice el periodo de incubación. Dado que el crecimiento de *Legionella* es lento y puede verse inhibido o enmascarado por el de otros microorganismos, se recomienda el empleo de un microscopio de disección con iluminación incidente oblicua. Se registra el número de colonias presuntivas de *Legionella* presentes.

Las colonias de *Legionella* generalmente presentan un color blanco grisáceo pero pueden también ser de otros colores. Las colonias son planas con bordes bien definidos y presentan un aspecto característico de vidrio esmerilado. Bajo la luz ultravioleta las colonias de varias especies (*L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. cherrii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. gratiana*, *L. parisiensis*, *L. steigerwaltii*, *L. tucsonensis*) presentan autofluorescencia de color blanco brillante; las especies *L. erythra* y *L. rubrilucens* aparecen rojas. Las colonias de *L. pneumophila* aparecen de color verde mate frecuentemente teñido de amarillo. El color de la fluorescencia puede ayudar a diferenciar las colonias en las muestras que contienen diferentes tipos de *Legionella*. Para evitar la muerte o daño a las bacterias hasta el punto de no ser recuperables, las placas no deben estar expuestas a la luz ultravioleta durante un tiempo excesivo.

## 8.6 Confirmación de las colonias presuntivas en medio de cultivo: agar BCYE y agar BCYE-cys

Se cultiva a partir de la(s) placa(s) que presenten el mayor número de colonias presuntivas de *Legionella* por volumen de agua. Cuando exista un solo tipo de colonias, se subcultivan tres colonias presuntivas. Si en la placa se desarrollan más de un tipo de colonias presuntivas morfológicamente diferentes, se toma al menos una colonia de cada tipo. Se realiza un subcultivo simultáneo en una placa de agar BCYE y en una placa de agar BCYE-cys. Tener cuidado de no arrastrar medio de cultivo con la colonia y en inocular en primer lugar la placa de agar BCYE-cys y, a continuación, la placa de agar BCYE. Ambas placas se cultivan a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 2 a 5 días.

La identificación de las colonias de *Legionella* incluye:

- Morfología característica.
- Comprobación de crecimiento en BCYE y ausencia de crecimiento en BCYE-cys.



**ADAPTaRES**

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



- Tinción de Gram. *Legionella* es un bacillo gran negativo que se tiñe débilmente con la coloración de contraste, por lo que es recomendable a utilización de fuchsina básica al 0,1% en lugar de safranina en esta tinción.

Se deben confirmar 5 o 6 colonias por muestra de agua analizada, ya que es frecuente que una misma muestra contenga varias especies o serogrupos de *Legionella*. Se anotan los resultados obtenidos en cada placa.

## 9. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Para estimar el recuento, cada día se deben contar y anotar el número de colonias características en cada una de las placas de GVPC, para cada muestra de agua analizada, aunque la identificación se realice en 2 o 3 colonias por placa. Para estimar el número formadoras de colonias (UFC) de *Legionella* presentes en la muestra de agua original, se selecciona la placa de GVPC o el grupo de placas (procedentes del mismo medio de cultivo) que presenten el máximo de colonias confirmadas por volumen de agua. La estimación del número de UFC en la muestra original se realiza aplicando la fórmula:

$$C = [(N \cdot V) / J] \cdot (1/S)$$

Donde:

- C es el número de UFC por litro de la muestra original.
- N es el número de colonias en la placa de GVPC con mayor número de colonias.
- V es el volumen (ml) del concentrado utilizado.
- J es el volumen (ml) inoculado en la placa.
- S es el volumen (litros) que fue usado del litro original.

El propósito de este procedimiento es demostrar la presencia o ausencia de *Legionella*, por lo que la presencia de colonias se informará como el número de colonias de *Legionella* estimado expresado en



**ADAPTaRES**

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



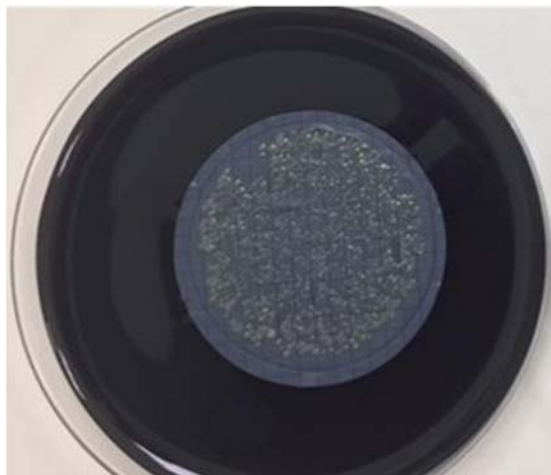
UFC/l, y la ausencia de colonias como “no detectada” en el volumen analizado indicando el límite de detección.

Como en esta técnica se concentra 1 l, los límites son de 100 UFC/l a 15000 UFC/l. Este límite se debe a que:

- La muestra se concentra en 10 ml.
- Cada placa se inocula con 0,1 ml.
- En una placa se pueden contar entre 1 y 150 colonias (UFC).

Al hacer los cálculos para poder expresar los resultados en 1 litro, el límite de detección obtenido es 100 UFC/l. y el rango de recuento está comprendido entre 100 y 15000 UFC/l.

## 10.OBSERVACIONES



*Legionella* spp. sobre filtro en agar GVP





**ADAPTRES**

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



**MAC 2014-2020**  
Cooperação Territorial

**Interreg**   
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



*Legionella* spp. en agar BCYE